

## 绿僵菌异戊烯基转移酶基因的克隆及表达谱分析

殷从松, 金凯, 夏玉先\*

(重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆市功能基因及调控技术重点实验室, 重庆 400030)

**摘要:**【目的】克隆绿僵菌异戊烯基转移酶(*Mpt*)基因,了解该基因的结构和表达特征。【方法】采用 SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript)技术和 PCR 技术,扩增 *Mpt* 基因全长 cDNA 序列和 DNA 序列,用 qRT-PCR 方法分析该基因在绿僵菌不同侵染时期的表达谱。【结果】*Mpt* 基因含 2 个外显子和 1 个内含子,CDS 区为 1026bp (GenBank 登录号 GU271134),编码 341 个氨基酸;qRT-PCR 分析表明,该基因在绿僵菌侵染的不同时期表达水平有显著差异,特别是在寄主昆虫体内生长的后期高表达。【结论】首次克隆了绿僵菌的 *Mpt* 基因,弄清了该基因具有在侵染后期高表达等特征,为研究该基因的功能奠定了基础。

**关键词:** 昆虫病原真菌;异戊烯基转移酶;SMART 技术;qRT-PCR;表达谱

**中图分类号:** Q814      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0897-06

绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 作为最重要的昆虫病原真菌之一,在害虫生物防治中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。然而,同其它昆虫病原真菌一样,绿僵菌致死昆虫的时间较长,影响了其广泛应用。因此,加强绿僵菌的分子机理研究,对于充分挖掘其生防潜力具有重要意义。国内外学者通过多年的努力,在其侵染致病的分子机理的研究方面已取得了较好的进展。研究表明,绿僵菌能够直接穿透寄主的体表进入昆虫体内,并在血淋巴中大量繁殖。在真菌穿透寄主体壁过程中会产生一些水解酶,其中蛋白酶和几丁质酶在此过程中起着降解昆虫表皮的蛋白、几丁质和壳多糖等作用<sup>[2-4]</sup>。进入昆虫血腔后,绿僵菌特异表达的基因 *MOS1* (*Metarhizium osmosensor*)使其适应昆虫体内的高渗透压环境<sup>[5]</sup>,侵入血淋巴后快速特异表达胶原原基因 *MCL1* (*Metarhizium collagen-like protein*)以逃避寄主的免疫反应<sup>[6]</sup>。同时,绿僵菌会分泌酸性磷酸酶和海藻糖酶到寄主体内,降解昆虫血液中的有机磷和海藻

糖,产生无机磷和葡萄糖,为真菌在昆虫体内繁殖与生长提供磷营养和碳源<sup>[7-9]</sup>,并通过消耗寄主营养、干扰代谢、分泌毒素及破坏寄主组织结构等方式引起昆虫死亡<sup>[4]</sup>。真菌的侵染过程十分复杂,目前的研究仍不能完全阐明其侵染致病的分子机理。因此,分离克隆与真菌侵染致病相关基因对于进一步阐明昆虫病原真菌的致病分子机制十分必要。

在前期工作中,本实验室成功构建了绿僵菌在蝗虫体内与体表生长阶段的差减 cDNA 文库,对该文库进行序列比对分析发现了一个编码异戊烯基转移酶的 EST 序列<sup>[10]</sup>,并通过 SMART 技术得到其全长 cDNA 序列,命名为 *Mpt* (*Metarhizium prenyl transferase*)。有关 *Mpt* 及其同源基因在昆虫致病真菌中的作用在国内尚未见报道。研究表明,异戊烯基转移酶能够催化异戊烯基二磷酸 (isoprenyl diphosphate, IPP) 与其异构体二甲基烯丙基二磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 通过缩合反应得到牻牛儿基二磷酸 (geranyl diphosphate, GPP),并

基金项目:国家自然科学基金(30771446)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-23-65120486; E-mail: yuxianxia@equ.edu.cn

作者简介:殷从松(1983-),男,安徽全椒人,硕士研究生,从事昆虫微生物分子机制研究。E-mail: yincongsong@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-12-18; 修回日期:2010-01-29

在此基础上陆续加入 IPP 单位而得到其它异戊烯类化合物<sup>[11]</sup>。另外,该基因与许多微生物的次生代谢产物的合成有关,在真菌生长发育过程中起重要作用。为了进一步了解该基因在绿僵菌生长发育及侵染致病过程中的作用,本研究克隆了绿僵菌的 *Mpt* 基因,用生物信息学方法分析了该基因的结构特征,采用定量 PCR 技术分析了该基因在各个时期的表达特征,以明确其在特定生长发育和侵染阶段的重要性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株和昆虫:**金龟子绿僵菌 CQMa102 蝗变种 (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) 菌株,由重庆大学基因工程中心从黄脊竹蝗 (*Ceracris kiansu* Tsai) 染病虫尸上分离得到,专用于防治蝗虫。该菌株由中国普通微生物保藏中心 (CGMCC) 保存,登记号为 1877。大肠杆菌 JM109 购自博大派克公司。东亚飞蝗由重庆大学基因工程研究中心饲养并提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**LA Taq 酶、Random Primer Labeling Kit、限制性核酸内切酶 (TaKaRa); AMV 反转录酶 (Promega); Trizol 试剂、SuperScript<sup>®</sup> II 反转录酶 (Invitrogen); VersaDoc 凝胶成像系统、PCR 热循环仪 (Bio-Rad); DU640 紫外分光光度计 (BECKMAN); 各种引物和 DNA 测序委托上海生工完成。

**1.1.3 培养基:**LB 培养基<sup>[10]</sup>, PDA 培养基<sup>[5]</sup>, 1/4 SDA 培养基 (葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 2.5 g/L, 酵母浸膏 5 g/L, 琼脂 18 g/L, pH 6.0), 查氏培养基 (NaNO<sub>3</sub> 2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g/L, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 6.7)。

### 1.2 金龟子绿僵菌 *Mpt* 基因的克隆

**1.2.1 金龟子绿僵菌基因组 DNA 和总 RNA 的提取:**利用真菌基因组提取试剂盒 (Bioflux) 提取绿僵菌基因组 DNA; 根据 Trizol 总 RNA 提取说明书, 提取总 RNA, 并反转录合成 cDNA 一链。

**1.2.2 EST 序列分析及 blastx 比对:**根据所构建的绿僵菌侵染蝗虫时期的差减文库, 挑选 EST (G0004730), 经过比对发现该基因序列与其它病原菌的异戊烯基转移酶基因的相似性较高 ( $E = 2 \times 10^{-46}$ )。

**1.2.3 SMART 技术获取绿僵菌 *Mpt* 基因 cDNA 全长序列:**根据已有的 EST 序列设计下游嵌套引物: Mpt-1: 5'-TTCCACACCGAGAACGGGCGG-3' 和 Mpt-2: 5'-GCTTTGAGCCCATCTCTG-3', 再和上游接头引物 5' PCR Primer: 5'-AAGCAGTGGTATCAACG CAGAGTT-3' PCR 扩增该基因的 5' 末端并将扩增得到的 DNA 片段切胶回收, TA 克隆转化大肠杆菌后挑取阳性克隆送测序。利用 DNAMAN 软件将获得的序列和已有的 EST 序列进行拼接, 得到了 cDNA 全长序列。

**1.2.4 *Mpt* 基因全长 DNA 序列的获得:**根据 cDNA 全长序列设计基因特异性引物: Mpt-QC (F): 5'-TTGGTTCACAGGTCGCTTCAT-3' 和 Mpt-QC (R): 5'-TGCCGTTTTGTTTCATCTGTTCC-3'; 以绿僵菌基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。将所获得的 DNA 序列与 cDNA 进行比对, 进而明确基因的结构。

**1.2.5 *Mpt* 基因结构及预测蛋白的生物信息学分析:**根据 <http://ncbi.nlm.nih.gov/http://cn.Expasy.org> 网站提供的生物信息学软件进行在线分析。核苷酸和氨基酸序列同源比对用 blast 在线工具完成; 蛋白质的二级结构用 SOPMA 分析并 Swiss-Model 进行同源建模。

### 1.3 定量 RT-PCR 分析 *Mpt* 基因在不同时期的表达量

**1.3.1 菌丝的收集和总 RNA 的提取:**分别收集附着孢时期, 侵染蝗虫第 5 天和第 7 天的血淋巴, 绿僵菌在蝗虫产孢时期, 及 1/4SDA 液体培养基的绿僵菌为材料, 提取总 RNA, 并分别反转录成 cDNA 一链, 设计特异引物 MptR-F: 5'-CGTCCTCCTCCGAGAAAC-3' 和 MptR-R: 5'-CGGTGTGGAA TTGCTCAAGG-3'; 同时以三磷酸甘油醛脱氢酶基因作为内参基因, 设计的引物: GAPDH (F): 5'-GACTGCCCGCATTGAGAAG-3' 和 GAPDH (R): 5'-AGATGGAGGAGTTGGTGTG-3'。

**1.3.2 定量 PCR 检测 *Mpt* 基因的相对表达量:**以各个时期的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增。本实验采用的仪器是 iCycler<sup>™</sup> Real Time PCR System (Bio-Rad, USA), 反应混合液为 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> Master mix kit (TaKaRa, Japan) 提供。反应体系为 (20  $\mu$ L): 2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> Master mix, GAPDH 引物、*Mpt* 特异引物 (终浓度分别为 0.1  $\mu$ mol/L、0.2  $\mu$ mol/L、0.2  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L cDNA。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环; 95  $^{\circ}$ C

15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 15 s, 40 个循环。为了确保结果的可重复性, 每个反应设置 3 次样品重复。PCR 扩增结束后立即进行熔解曲线分析, 以验证扩增的特异性。熔解曲线的程序为: 95 °C 1 min; 55 °C 1 min; 从 55 °C 开始每升高 0.5 °C 保持 10 s, 连续升高 80 次(到 95 °C 为止)。

## 2 结果和分析

### 2.1 金龟子绿僵菌 *mpt* 基因 cDNA 和 DNA 全长序列的克隆

利用引物 Mpt-1 和 Mpt-2 对绿僵菌 cDNA 进行扩增, 得出该基因的 5' 序列。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测获得的条带与预期大小一致, 为 700 bp。再与原有的 EST 序列进行拼接后获得 cDNA 全长(图略)。利用引物 Mpt-QC(F) 和 Mpt-QC(R) 扩增获得 DNA 序列并与 cDNA 序列进行比对, 结果发现 DNA 序列中含有两个外显子和一个为 76 bp 的内含子。

### 2.2 *Mpt* 基因结构分析

*Mpt* 基因 cDNA 全长 1194 bp, 起始密码子 ATG 位于 63 bp 处, ATG 密码子附近符合 Kozak 规则<sup>[12]</sup> (AXXATGG), 终止密码子位于 1088 bp 处, 编码

341 个氨基酸, 3' 端有 Poly 尾。相对分子量为 38486.97 u, 等电点(PI)为 6.41, 为酸性蛋白。

### 2.3 预测蛋白生物信息学分析

**2.3.1 信号肽切割位点及氨基酸修饰位点分析** 运用在线分析软件: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 对编码的氨基酸序列进行分析, 发现其信号肽序列为 MAWFTGRFMAGEVAAILSAFAG, 切割位点位于 SAFAG-YLVQN 之间, 初步判断是分泌型蛋白。同时, 利用软件 <http://www.predictprotein.org> 预测其在 28 位(NKSH)、126 位(NQTT)氨基酸处存在 N-糖基化位点, 90 位(KNDDPEKY)处有一个酪蛋白激酶 2 磷酸化位点, 135 位(GSCETA)和 175 位(GQDLSL)分别具有一个十四烷基位点, 166 位(LKALEQMLEGQDLSLVWRRDGL)具有亮氨酸锌指结构。

**2.3.2 蛋白质二级结构分析及同源建模:** 运用 SOPMA 软件 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 预测绿僵菌 Mpt 蛋白的二级结构(图 1), 表明该蛋白含约 56.60% 的  $\alpha$  螺旋, 2.35% 的  $\beta$  转角, 7.92% 的延伸串, 33.14% 的不规则卷曲。在 SWISS-MODEL 中进行同源建模, 得到该蛋白质的三维结构(图 2)。

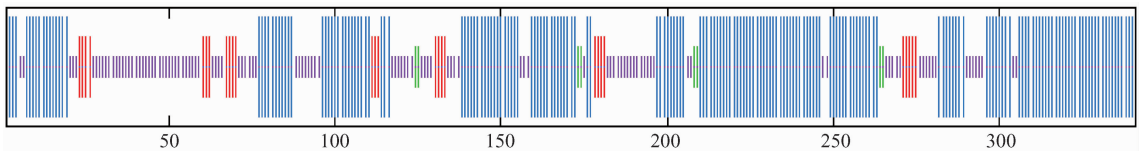


图 1 金龟子绿僵菌 Mpt 蛋白二级结构的预测

Fig. 1 Predicted secondary structure for Mpt protein from *Metarhizium ansopliae* strain CQMa102. Alpha helix: Blue; Extended strand: Red; Beta turn: Green; Random coil: Purple.

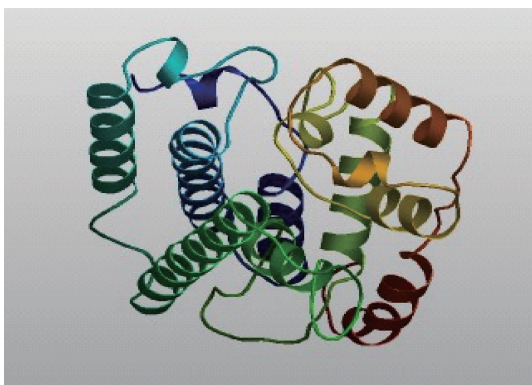


图 2 金龟子绿僵菌 Mpt 蛋白三级结构同源建模

Fig. 2 The Mpt 3D structure predicted by Swiss-model. Modeled residue range: 56 to 305; based on template 2q80C (2.70 Å); Evalue: 2.40e-24.

### 2.4 *Mpt* 基因蛋白同源性分析

利用 PSI-BLAST 软件对 *Mpt* 基因预测蛋白进行同源性序列比对, 结果发现该蛋白与真菌 *Aspergillus clavatus* (XP\_001273516.1), *Aspergillus flavus* (XP\_002381458), *Aspergillus niger* (XP\_001394251), *Aspergillus oryzae* (XP\_001824349), *Botryotinia fuckeliana* (XP\_001559667), *Neotyphodium lolii* (ABF20225.1) 和 *Penicillium paxilli* (AAK11529.1) 的该编码蛋白具有较高的同源性, E 值分别为  $8 \times 10^{-75}$ 、 $5 \times 10^{-79}$ 、 $6 \times 10^{-77}$ 、 $1 \times 10^{-93}$ 、 $2 \times 10^{-45}$ 、 $1 \times 10^{-133}$ 、 $6 \times 10^{-68}$ , 同时采用 DNAMAN 软件进行多重序列同源比对, 发现在一些位置存在比较保守的氨基酸序列(图 3)。

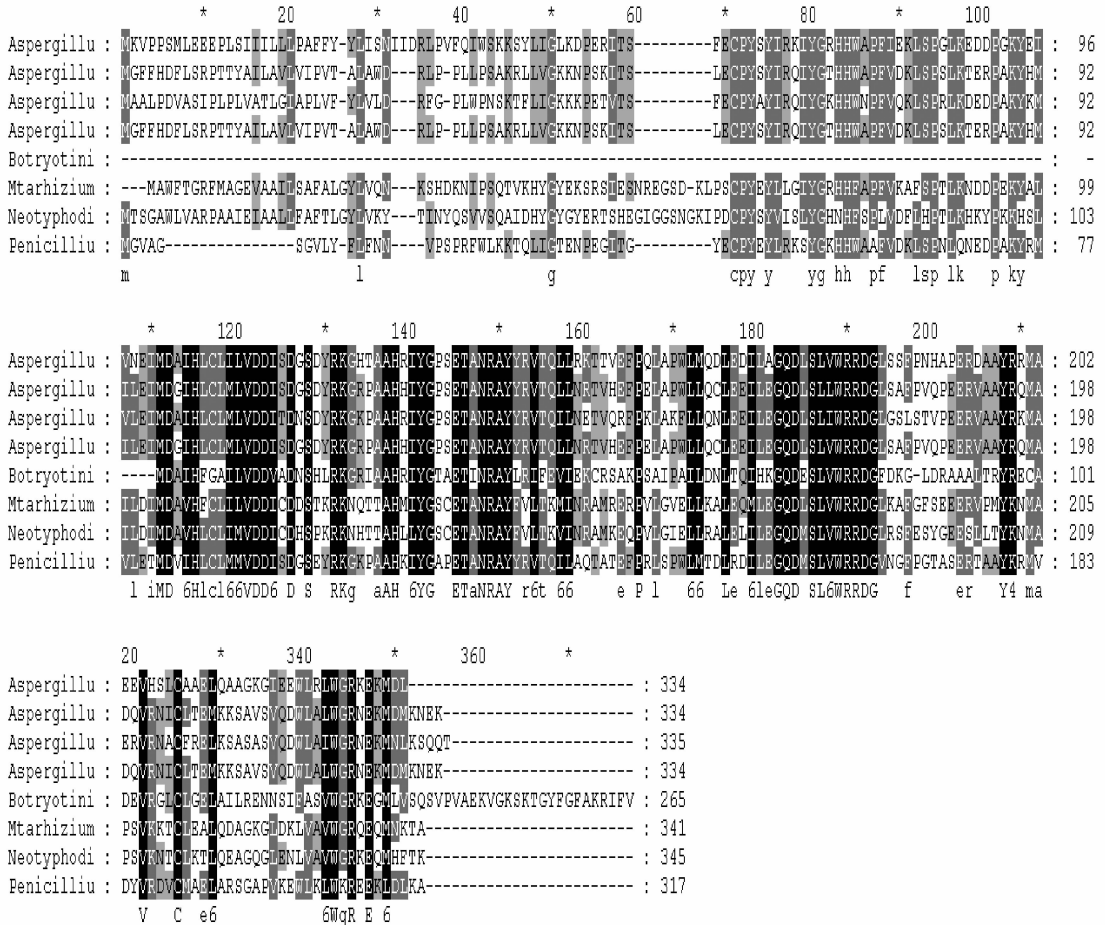


图3 Mpt 与其它真菌异戊烯基转移酶的氨基酸序列相似性分析

Fig. 3 Putative amino sequence alignment of Mpt with homologs of prenyl transferase from other filamentous fungi. The identical amino acids are highlighted on a black background, conserved amino acids are shown on a light grey background, and similar amino acids are shown on a dark grey background.

### 2.5 Mpt 基因的表达谱分析

以不同侵染时期的绿僵菌 cDNA 为模板, 定量 PCR 检测 *Mpt* 基因在每个阶段的表达量。结果表明该基因在附着孢阶段、侵染初期以及在 1/4SDA 培养基的条件下, 表达量都很低, 相对表达量分别为 17.68%, 17.70% 和 4.85%, 而侵染后期及虫体产孢时期与之相比, 表达量明显增加, 相对表达量为 81.23% 和 100% (图 4)。

### 3 讨论

绿僵菌 *Mpt* 基因与已报道的其它真菌的 *Mpt* 基因相比, 编码的氨基酸数目大部分一致, 但是在个别真菌中该基因编码的氨基酸数目明显偏少 (图 3)。绿僵菌 *Mpt* 基因的内含子的剪切符合 GT-AG 法则, 另外, 在大多数真核生物基因中, cDNA 的第一个起始密码子为 ATG, 而且在起始密码子上游的第三位点往往是 A, 本研究的基因符合上述两个特点<sup>[12]</sup>。

选择了 8 种真菌的 *Mpt* 氨基酸序列进行了多重序列比对, 发现与其它真菌 *Mpt* 氨基酸序列的相似性都比较高, 尽管有的氨基酸序列相差较多, 但是依然存在 2-3 个同源性很高的保守区域, 我们推断这些区域对该蛋白的功能是比较重要的。

通过 SOPMA 软件预测可知, 金龟子绿僵菌 *Mpt* 基因编码的蛋白主要有由  $\alpha$  螺旋和不规则卷曲构成, 这也与通过 SWISS-MODEL 同源建模得出的三维结构相一致。而  $\beta$ -转角和延伸链占很少的一部分, 它们散布于整个蛋白质中。一般认为  $\alpha$  螺旋和  $\beta$ -折叠结构规则, 主要起稳定蛋白质分子结构的作用, 伸展结构和无规则卷曲往往突出于蛋白表面, 构成蛋白质的功能区域。

定量 PCR 分析 *Mpt* 基因的表达特征表明, 该基因在不同侵染时期的表达量有明显差异。在离体培养基及蝗虫的翅膀上, 该基因几乎不表达, 而在寄主体内定殖的前期, 表达量开始有所增加, 到了后期及

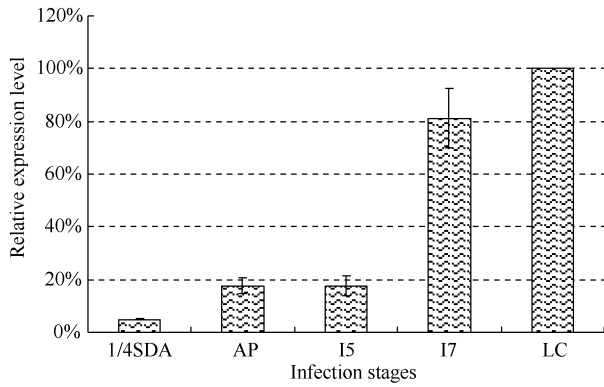


图4 定量 PCR 检测分析 *Mpt* 基因在不同侵染时期的表达情况

Fig.4 Relative expression of *Mpt* in different stages of infection process by quantitative RT-PCR analysis, Error bars are standard deviations of three trials, LC (calibrated as 100%). (AP, the total RNA was obtained from the conidia/mycelia mixture in the course of appressorium formation on locust wing without treatment of RNA fragmentation buffer; I5 and I7, the total RNAs were obtained from the haemolymph collected at the time point 5 days and 7 days after inoculation respectively; LC, locust cadaver.

寄主死亡后产孢阶段表达量最高。据此,我们可以推断该基因的表达与寄主体内环境的诱导密不可分。由于该基因与许多微生物的次生代谢产物的合成有关<sup>[13]</sup>,该基因在侵染后期高表达表明,绿僵菌可能产生大量的次生代谢产物以满足其在寄主体内生存的需要。

真核生物中,蛋白质的异戊烯基化对于信号转导、细胞骨架重塑、细胞周期循环以及诱导细胞凋亡和囊泡运输是必需的<sup>[14]</sup>。在烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 中,异戊烯基转移酶基因与烟曲霉毒素 B 的合成直接相关,它催化烟曲霉毒素 B 合成的最后一步反应,该基因缺失会导致烟曲霉毒力的降低<sup>[15]</sup>。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中,该基因缺失后生长受到严重的影响<sup>[16]</sup>。另外,链霉菌 (*Streptomyces roseochromogenes*) 中研究表明,该基因参与氨基香豆素类抗生素 clorobiocin 的合成,此类抗生素具有抑制细菌 DNA 解旋酶的活性<sup>[17]</sup>。绿僵菌侵染寄主的后期可能通过上调该基因的表达,以增加异戊烯基转移酶的酶量,从而产生更多的抗生素来抑制细菌等竞争性微生物的生长。因此,我们可以推测,该基因可能参与病原真菌与其他微生物竞争,尤其在寄主病程后期,病原真菌需要抑制细菌等竞争性微生物的迅速生长。

目前,*Mpt* 基因及其同源基因的功能研究较少,

而在昆虫病原真菌中更是未见报道。因此,*Mpt* 基因的成功克隆及表达谱分析对以后研究该基因在病原真菌生长发育及致病过程中的作用奠定基础。

## 参考文献

- [1] 李增智, 樊美珍. 真菌生物技术与真菌杀虫剂的发展. 北京: 科学出版社, 2000: 115-120.
- [2] Charnley AK. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. // Wicklow and Söderström. The Mycota, IV Environmental and Microbial Relationships. Berlin and Heidelberg: Springer, 1997: 185-201.
- [3] Charnley AK, St Leger RJ. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. // Cole GT, Hoch HC. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. 1991, 267-286.
- [4] Clarkson JM, Charnley AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in microbiology*, 1996, 4:197-203.
- [5] Wang CS, Duan ZB, St Leger RJ. MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* Is Required for Adaptation to Insect Host Hemolymph. *Eukaryotic Cell*, 2008, 2:302-309.
- [6] Wang CS, St Leger RJ. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *PNAS*, 2006, 103:6647-6652.
- [7] Xia YX, Clarkson JM, Charnley AK. Acid phosphatases of *Metarhizium anisopliae* during infection of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Arch Microbiol*, 2001, 176: 427-434.
- [8] Xia YX, Dean P, Judge AJ, Charnley AK. Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Insect Physiology*, 2000, 46:1249-1257.
- [9] Xia YX, Clarkson JM, Charnley AK. Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol*, 2002, 80: 139-147.
- [10] Zhang CB, Xia YX. Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. *Curr Genet*, 2009, 55(4): 399-407.
- [11] Kellogg BA, Poulter CD. Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1:570-578.

- [12] Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 19867-19870.
- [13] Robert JR. Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 303: 1-7.
- [14] Sebastian MS, Stefan W, Frank E. Protein Prenyltransferases: Anchor Size, Pseudogenes and Parasites. *Biological Chemistry*, 2003, 384 (7): 977-989.
- [15] Grundmann A, Kuznetsova T, Afiyatullof SS, Li SM. FtmPT2, an *N*-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem*, 2008, 13: 2059-2063.
- [16] Miyuki S, Akihiko N. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two cis-prenyltransferases with different properties and localizations. Implication for their distinct physiological roles in dolichol synthesis. *Genes to Cells*, 2001, 6: 495-506.
- [17] Florence P, Lutz H. CloQ, a prenyltransferase involved in chlorobiocin biosynthesis. *PNAS*, 2003, 100: 2316-2321.

## Cloning and expression of prenyl transferase gene of *Metarhizium anisopliae*

Congsong Yin, Kai Jin, Yuxian Xia\*

(College of Bioengineering of Chongqing University, Genetic Engineering Research Centre of Chongqing University, Key Laboratory of Gene Function and Regulation at Chongqing, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To clone and identify prenyl transferase gene from *Metarhizium anisopliae* and to understand the gene structure and expression. [ **Methods** ] Using Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript (SMART) method, we isolated the full length cDNA sequence and DNA sequence. Then we used quantitative RT-PCR analysis of the gene expression levels at different stages of colonization of host hemolymph by *M. anisopliae*. [ **Results** ] The *Mpt* gene had two exons and one intron and the CDS was 1026 bp which encoded a protein with 341 amino acid residues; qRT-PCR analysis showed that the gene expression levels were significantly different, especially highly up-regulated at the late stages. [ **Conclusion** ] The *Mpt* gene was successfully cloned from *M. anisopliae* for the first time and the gene had the characteristic of high expression levels at the late stages.

**Keywords:** entomopathogenic fungi; prenyl transferase; SMART(Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript); qRT-PCR; expression profile

(本文责编:王晋芳)